

氏 名	真田 英明
学 位 の 種 類	博士 (工 学)
学 位 記 番 号	第 5322 号
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当者
学 位 論 文 名	絶対嫌気性細菌 <i>Desulfovibrio vulgaris</i> における酸化的 DNA 損傷修復酵素に関する研究
論 文 審 査 委 員	主 査 教授 井上 英夫 副主査 教授 田辺 利住 副主査 教授 東 雅之 副主査 准教授 北村 昌也

論 文 内 容 の 要 旨

8-オキシグアニン(8-oxoG)は DNA の酸化損傷の一つで、アデニンとも安定な塩基対を形成することができるので、遺伝子に変異を引き起こす原因となる。多くの好気性生物はこの変異に対し、MutM(8-oxoG DNA グリコシラーゼ)、MutY(アデニン DNA グリコシラーゼ)および MutT(8-oxodGTP 加水分解酵素)からなる修復機構を有している。一方、硫酸還元菌は、絶対嫌気性細菌に分類されており、酸素により生育阻害を示す。硫酸還元菌の酸化的 DNA 損傷に対する修復機構を明らかにすることを目的として遺伝子工学的な手法によって組換え体 MutM、MutY および MutT を得て研究を行った。その内容を本論文の第 1 章から第 4 章にまとめた。

第 1 章では、研究の背景および目的について述べている。

第 2 章では、MutM(8-oxodG DNA グリコシラーゼ)に関する研究をまとめた。硫酸還元菌由来 MutM のアミノ酸配列は他の好気性生物由来の MutM と比べて大きな挿入配列が存在していたが、8-oxoG を基質として認識し切断することが分かった。大腸菌由来 MutM の立体構造と比較することにより、この挿入配列は酵素表面に存在するが、基質との結合や活性に影響しない新たなループを形成していると考えた。ウエスタンブロッティングおよび RT-PCR を行ったが、硫酸還元菌内でのこの遺伝子の発現を確認することはできなかった。これは硫酸還元菌が絶対嫌気性細菌でありほとんど酸化損傷の発生しない環境下で生育しているためであると考えた。その絶対嫌気性細菌由来の組換え体 MutM が十分な活性を保持しているという事実は、逆に、MutM が生物の生育に対して重要であるということを示唆していると考えた。

第 3 章では、硫酸還元菌由来の MutY(アデニン DNA グリコシラーゼ)に関する研究をまとめた。好気性生物由来の MutY において基質 DNA との結合に関与していると考えられている鉄硫黄クラスター結合ドメインの配列は CX₆CX₂CX₅C であり高度に保存されているが、硫酸還元菌由来 MutY においては CX₅CX₂CX₅C であった。組換え体 MutY は、鉄硫黄クラスター由来の特徴的な可視吸収を示さないにもかかわらず、わずかながら活性を示した。鉄硫黄クラスターの形成が酵素活性に影響を与えていると考え、この領域に変異を導入した MutY は、鉄硫黄クラスター由来の特徴的な可視吸収を示した。

第 4 章では、硫酸還元菌由来の MutT(8-oxodGTP 加水分解酵素)に関する研究をまとめた。硫酸還元菌由来 MutT のアミノ酸配列はピリミジン三リン酸加水分解酵素と高い相同性があった。実際、8-oxodGTP に対し活性を示したが、dCTP や 5-methyl-dCTP に対しても高い活性を示した。これらの結果から硫酸還元菌由来の酸化的 DNA 損傷修復酵素群は、8-oxoG 変異を修復するために十分な活性を保持していることを示唆した。

本研究により、硫酸還元菌由来の酸化的 DNA 損傷修復酵素群は 8-oxodG 変異を修復するために十分な活性を保持していることが示唆された。硫酸還元菌と酸素の関わりは従来考えられてきたよりも複雑であると考えられる。しかし、本研究によって、硫酸還元菌の酸素耐性に関する新たな知見を得られたと考えている。

論文審査の結果の要旨

硫酸還元菌を含む絶対嫌気性細菌を工業的に応用する場合、酸素を用いた生育制御が最も簡便で効率的であると考えられる。そのためには、絶対嫌気性細菌の酸素耐性のメカニズムを明らかにする必要がある。本研究で著者は、硫酸還元菌 *Desulfovibrio vulgaris* における酸化的 DNA 損傷修復酵素の生化学的、分子生物学的研究を行い、硫酸還元菌由来の酸化的 DNA 損傷修復酵素群が 8-oxodG 変異を修復するために十分な活性を保持していることを示し、これらの内容を本論文にまとめている。

第 1 章では、研究の背景および目的について述べている。

第 2 章では、MutM(8-oxodG DNA グリコシラーゼ)に関する研究をまとめている。著者は、この酵素の遺伝子をクローニングし、その塩基配列を決定している。さらに組換え MutM の発現・精製系を確立して活性測定を行い、硫酸還元菌由来の MutM は他の生物由来のものに比べて大きな挿入配列が存在するにもかかわらず 8-oxodG を基質として認識し切断する活性を保持していることを明らかにしている。さらに、硫酸還元菌内における MutM 遺伝子の発現について研究を行っている。これらの結果から絶対嫌気性細菌と酸化損傷の関わりについて考察し、生物における MutM の重要性を示している。

第 3 章では、硫酸還元菌由来の MutY(アデニン DNA グリコシラーゼ)に関する研究をまとめている。著者は、この酵素の遺伝子をクローニングし、その塩基配列を決定している。硫酸還元菌由来の MutY は好気性生物由来の酵素と比較して鉄硫黄クラスター結合ドメインに違いがあることを見出し、好気性生物型に置換することにより鉄硫黄クラスター由来の特徴的な可視吸収をもつ酵素となることを明らかにしている。

第 4 章では、硫酸還元菌由来の MutT(8-oxodGTP 加水分解酵素)に関する研究をまとめている。著者は、この酵素の組換え体の発現・精製系を確立し、活性を測定している。また、基質特異性について検討し、8-oxodGTP に対してだけでなく dCTP や 5-methyl-dCTP に対しても高い活性を示すことを明らかにしている。

最後に以上の研究成果を総括している。

以上のように、本論文は硫酸還元菌における酸素耐性機構の解明に繋がる多くの知見を提供している。これらの成果は、生物工学の発展に大いに寄与するものである。よって、本論文の著者は博士(工学)の学位を受ける資格を有するものと認める。